



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 278 737**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

A23C 9/12 (2006.01)

A23C 19/00 (2006.01)

C07K 14/335 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01923715 .5**

(86) Fecha de presentación : **30.03.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1268808**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

(54) Título: **Mutantes de *Lactobacillus casei* con regulación defectuosa del catabolismo del carbono.**

(30) Prioridad: **31.03.2000 EP 00400894**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

(73) Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR
Consejo Superior de Investigaciones Científicas y
COMPAGNIE GERVAIS DANONE**

(72) Inventor/es: **Deutscher, Josef;
Pérez Martínez, Gaspar;
Monedero García, Vicente;
Viana Ballester, Rosa;
Benbadis, Laurent;
Pierson, Anne y
Faurie, Jean-Michel**

(74) Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutantes de *Lactobacillus casei* con regulación defectuosa del catabolismo del carbono.

5 La presente invención se refiere a cepas mutantes de las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* con una ruta de regulación del catabolismo del carbono defectuosa, y a su utilización en el procesamiento de alimentos fermentados.

10 Tal como se define en la presente memoria, el grupo *Lactobacillus casei* incluye las especies *L. casei*, así como las especies *L. paracasei* (antiguamente subespecie *paracasei* de *L. casei*), *L. rhamnosus* (antiguamente subespecie *rhamnosus* de *L. casei*) y *L. zae*. Esas especies están filogenéticamente emparentadas, de manera muy cercana, entre sí y sus respectivos genes ADNr 16S y 23S siempre muestran una similitud superior al 97,5% [Mori *et al.*, Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 54-57, (1997)].

15 *L. casei* es reconocida como un prebiótico, es decir, un suplemento alimenticio microbiano vivo con un efecto positivo sobre la salud del consumidor, y se utiliza mucho como iniciador en la industria láctica y en la preparación de alimentos fermentados, más específicamente, alimentos que contienen fermentos vivos.

20 La represión catabólica por carbono (CCR) es un mecanismo regulador que permite a las bacterias elegir entre diferentes fuentes de carbono según su valor metabólico y cambiar de una fuente de carbono a otra en función de su disponibilidad en el medio de crecimiento. Una manifestación de la represión catabólica bien conocida es el crecimiento diauxico que ocurre cuando las bacterias son cultivadas en presencia de glucosa y lactosa. Las curvas de crecimiento diauxico muestran dos etapas distintas de crecimiento exponencial, separadas por un periodo de reposo. Durante la primera etapa de crecimiento, la glucosa reprime la síntesis de las enzimas necesarias para la utilización de lactosa, y por lo tanto, es la única fuente de energía de las bacterias. Cuando toda la glucosa es consumida, se da la
25 etapa de reposo, durante la cual se sintetizan las enzimas para la utilización de la lactosa, permitiendo que la lactosa sea utilizada como una fuente de energía durante la segunda etapa del crecimiento.

30 Un objetivo principal de la represión catabólica es el transporte de azúcares al interior de las células bacterianas. En la *L. casei*, este transporte se realiza predominantemente mediante fosfoenolpiruvato: sistema fosfotransferasa de azúcares (PTS).

35 El PTS de las bacterias gram positivas ha sido estudiado principalmente en *Bacillus subtilis*; se ha mostrado que afecta a la fosforilación de los azúcares y a su transferencia al interior de la célula mediante una cascada de fosforilaciones que implican las enzimas generales, no específicas del azúcar, EI y HPr, y las enzimas específicas del azúcar EIIA, EIIB y EIIC. La primera etapa es la fosforilación de EI a partir del fosfoenolpiruvato (PEP). La EI fosforilada (EI-P) cataliza la fosforilación de HPr, en el His-15 catalítico. La HPr fosforilada en su His-15 (referida como P-His-HPr) transfiere su grupo fosforilo a EIIA, que a su vez fosforiliza EIIB. La EIIB fosforilada (P-EIIB) asociada a la proteína de membrana EIIC, cataliza el consumo y la fosforilación simultánea de un carbohidrato específico.

40 Se ha mostrado que los componentes del sistema PTS, y más específicamente, la enzima HPr, están también implicados en otras rutas reguladoras.

45 Por ejemplo, P-His-HPr puede transferir su grupo fosforilo también a proteínas no PTS, tales como glicerol kinasa [Charrier *et al.*, J. Biol. Chem., 272, 14166-14174, (1997)] o a antiterminadores y activadores transcripcionales que poseen el dominio de regulación PTS (PRD) que contiene diversos sitios de fosforilación reconocidos por P-His-HPr [Tortosa *et al.*, J. Biol. Chem., 272, 17230-17237, (1997); Stülke *et al.*, Mol. Microbiol., 28, 865-874, (1998); Lindner *et al.*, Mol. Microbiol., 31, 995-1006, (1999)]. En todos los casos, la fosforilación dependiente de p-His-HPr lleva a la activación de la función de las proteínas no PTS y esta fosforilación se ha mostrado que sirve como un mecanismo de represión catabólica por carbono secundario en bacterias gram positivas [Deutscher *et al.*, J. Bacteriol., 175, 3730-3733, (1993); Krüger *et al.*, J. Bacteriol., 178, 2637-2644, (1996); Martin-Verstraete *et al.*, Mol. Microbiol., 28, 293-303, (1998)]. En la *Lactobacillus casei*, el antiterminador LacT, que regula la expresión del operón *lac*, contiene dos PRD y parece que es controlado por este mecanismo.

55 En las bacterias gram positivas, la HPr puede también ser fosforilada mediante la HPr kinasa/fosfatasa HprK bifuncional [Galinier *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1823-1828, (1998); Reizer *et al.*, Mol. Microbiol., 27, 1157-1169, (1998); Brochu y Vadeboncoeur, J. Bacteriol., 181, 709-717, (1999); Kravanja *et al.*, Mol. Microbiol., 31, 59-66, (1999)]. En la *Bacillus subtilis*, esta fosforilación, que ocurre en el Ser-46 regulador [Deutscher *et al.*, Biochemistry, 25, 6543-6551, (1986)], es estimulada mediante fructosa-1,6-bisfosfato e inhibida mediante fosfato inorgánico [Galinier *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1823-1828, (1998)]. La HPr fosforilada en Ser-46 (referida como P-Ser-HPr), participa en el mecanismo principal de represión/activación catabólica por carbono operativo en *bacilli* y presumiblemente en otras bacterias gram positivas [Deutscher *et al.*, Mol. Microbiol., 42, 171-178, (1997)]. Funciona como un correpresor para la proteína de control de catabolito CcpA, un miembro de la familia LacI/GaIR de los represores/activadores transcripcionales [Henkin *et al.*, Mol. Microbiol., 5, 575-584, (1991)]. El complejo formado entre CcpA y P-Ser-HPr se ha mostrado que enlaza a los elementos de respuesta de catabolito (cre) [Fujita y Miwa, J. Bacteriol., 176, 511-513, (1994); Gösseinger *et al.*, J. Mol. Biol., 266, 665-676, (1997); Kim *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9590-9595, (1998); Galinier *et al.*, J. Mol. Biol. 286, 307-314, (1999); Martin-Verstraete *et al.*, Mol. Microbiol., 28, 293-303, (1999)], sitios operadores que preceden o solapan los promotores o localizados en la región 5' de los operones y los genes reprimidos por catabolito [Hueck *et al.*, Res. Microbiol., 145, 503-518, (1994)]. Por

ejemplo, se encuentra un elemento cre funcional en la región promotor del operón de la lactosa *lacTEGF* de *L. casei*, que comprende los genes *lacE* y *lacF* que codifican respectivamente las enzimas de transporte de lactosa EIICB^{Lac} y EIIA^{Lac} conjuntamente con los genes que codifican una proteína antiterminadora (*lacT*), y una fosfo-beta-galactosidasa (*lacG*) [Gosalbes *et al.*, J. Bacteriol., 181, 3928-3934, (1999)].

5

Los genes que codifican componentes del sistema CCR, y más específicamente los genes relacionados con el sistema PTS, tales como *ptsI* y *ptsH* que codifican, respectivamente, las enzimas EI y HPr del sistema PTS, *hprK* que codifica la HPr kinasa/fosfatasa, y *ccpA* han sido caracterizados en algunas especies de bacterias gram positivas.

10

En la *L. casei*, el gen *ccpA* [Monedero *et al.*, J. Bacteriol., 179, 6657-6664, (1997)], y los genes *lacT*, *lacE*, *lacG* y *lacF* [Gosalbes *et al.*, referenciado anteriormente; Poter y Chassy, Gene, 62, 263-276, (1988); Alpert y Chassy, Gene, 62, 277-288, (1988); Alpert y Chassy, J. Biol. Chem., 265, 22561-22568, (1990); Alpert y Siebers, J. Bacteriol., 179, 1555-1562, (1997)] han sido clonados y caracterizados hasta ahora.

15

Recientemente, los presentes inventores han identificado, clonado y secuenciado los genes *ptsI*, *ptsH* y *HprK* de la *L. casei*.

20

La secuencia nucleotídica del operón *ptsHI*, y las secuencias peptídicas de HPr y EI de la *L. casei* se dan a conocer, respectivamente, en el listado de secuencias adjunto bajo los identificadores SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, y SEQ ID NO: 3. La secuencia del gen *HprK* está disponible en Genbank bajo el número de acceso Y18948.

25

Los presentes inventores han estudiado el efecto de las mutaciones en *ptsI*, *ptsH* y *hprK*, así como el efecto de las mutaciones en *ccpA* sobre las propiedades metabólicas y el crecimiento de la *L. casei*. Encontraron, de manera inesperada, que las cepas de *L. casei* con mutaciones que perjudicaban la regulación del mecanismo de represión catabólica por carbono que implica la enzima PTS HPr, y más específicamente las mutaciones que perjudicaban la regulación del sistema PTS, poseen una capacidad mejorada de producir compuestos útiles en la industria alimenticia, tales como compuestos de aroma y/o polisacáridos.

30

Un objetivo de la presente invención es la utilización de un mutante de la *L. casei* con por lo menos una mutación en el gen *ptsI* que perjudica la regulación del mecanismo de represión catabólica por carbono que implica la enzima PTS HPr, para la preparación de un producto alimenticio.

35

Preferentemente, dicho mutante presenta por lo menos una mutación en el gen *ptsI* que perjudica la capacidad de EI de fosforilar HPr.

40

Entre los ejemplos no limitativos de la *L. casei* que pueden ser utilizados según la invención se encuentran los mutantes que presentan por lo menos una mutación en el gen *ptsI* que genera una falta de expresión de la enzima EI, o en la expresión de una enzima EI desprovista de por lo menos un dominio activo de EI de tipo salvaje. Por ejemplo, un mutante de la invención puede obtenerse mediante la introducción de una mutación de cambio en el marco de lectura en la posición 870 de la secuencia SEQ ID NO:1. La inserción de cuatro nucleótidos (secuencia AATT) en esta posición genera un codón de stop, cuatro codones después de la posición de inserción. Esto resulta en la expresión de un proteína EI truncada desprovista de por lo menos los aminoácidos 110 a 574 de la EI de tipo salvaje, con la adición de cuatro nuevos codones, antes del codón de stop translacional.

45

La invención también proporciona mutantes de *L. casei* que presentan por lo menos una mutación en por lo menos el gen *ptsI*, en el que dicha mutación perjudica por lo menos una de las funciones de los productos de dicho gen.

50

Esto incluye, particularmente, mutantes de *L. casei* aptos para uso alimentario, que presentan por lo menos una mutación que perjudica por lo menos una de las funciones del gen *ptsI* implicado en la regulación del mecanismo de represión catabólica por carbono mediante la enzima PTS HPr.

55

Los "mutantes aptos para uso alimentario" se definen en la presente memoria como bacterias mutantes aceptables para la utilización en la preparación de alimentos. Para que sean catalogados como aptos para uso alimentario, los mutantes no deben comprender secuencias derivadas de microorganismos diferentes de los utilizados en la industria alimenticia. Preferentemente, no deben comprender secuencias derivadas de microorganismos diferentes a los que pertenecen a las especies de las que deriva el mutante. También, no deben comprender secuencias de ADN potencialmente dañinas, tales como genes de resistencia antibiótica.

60

Los mutantes de la invención pueden ser obtenidos mediante procedimientos convencionales de la biología molecular. A partir de la secuencia del gen *ptsI* de la *L. casei*, un experto en la materia puede fácilmente diseñar herramientas que permiten la realización de las mutaciones deseadas mediante mutagénesis dirigida. Dichas mutaciones pueden ser obtenidas mediante inserción, eliminación y/o sustitución de un nucleótido o de varios nucleótidos, adyacentes o no adyacentes.

65

Dichas mutaciones pueden, por ejemplo, ser obtenidas mediante la eliminación de una secuencia de ADN regulador o mediante la inserción, eliminación y/o sustitución en la misma, de un nucleótido o de varios nucleótidos, adyacentes o no adyacentes.

ES 2 278 737 T3

Dichas mutaciones también incluyen cualquier mutación que resulte en la producción de una proteína que presenta por lo menos una eliminación, inserción o sustituciones no conservativas de uno o varios residuos de aminoácidos en un dominio esencial para la actividad biológica de dicha proteína.

A continuación, el gen mutante obtenido de esta manera es clonado en un vector, preferentemente un vector de expresión, y utilizado para transformar las células huésped de *L. casei* mediante cualquier procedimiento adecuado, conocido en sí mismo. Los procedimientos y vectores adecuados para la transformación de la *L. casei* se dan a conocer, por ejemplo, en Posno *et al.* [Appl. Environ. Microbiol., 57, 1822-1828, (1991)].

A modo de ejemplo, puede utilizarse un vector extracromosomal capaz de replicar en *L. casei*. Sin embargo, con el fin de obtener mutantes estables, resulta preferente la utilización de un vector que permite la integración de un gen mutante en el cromosoma de la *L. casei*.

La integración de un gen mutante en el cromosoma bacteriano ocurre mediante la recombinación del material genético del vector en una posición homóloga (generalmente, el alelo de tipo salvaje del gen mutante) en el cromosoma bacteriano. La integración puede ser el resultado de un evento de recombinación simple o doble. Los eventos de recombinación simple resultan en la integración del vector completo. Los eventos de recombinación doble llevan a la escisión de las secuencias del vector exógeno.

A modo de ejemplo, un procedimiento para la integración de un gen *lacT*, *lacE* o *lacF* mutante en el cromosoma de la *L. casei* es dado a conocer por Gosalbes *et al.* [J. Bacteriol. 181, 3928-3934, (1999)]. Este procedimiento incluye la clonación de un gen de tipo salvaje en un plásmido integrativo (pRV300, con un marcador *Erm^R*), induciendo una mutación en el gen clonado (por ejemplo, mediante el corte del gen con una enzima de restricción e introduciendo una mutación convirtiendo el sitio de restricción en un extremo romo), transformando la *L. casei* con el plásmido que comprende el gen mutado, cultivando las bacterias en un medio selectivo que contiene eritromicina con el fin de seleccionar las bacterias que han integrado el plásmido mediante un evento de recombinación simple (que son *Erm^R*). Un cultivo adicional de estas bacterias *Erm^R*. Un cultivo adicional de estas bacterias *Erm^R* en un medio no selectivo (es decir, sin eritromicina) permite la obtención de bacterias que han experimentado un evento de recombinación doble que lleva a la escisión de las secuencias del vector.

Dicho procedimiento puede ser utilizado, por ejemplo, para obtener mutantes aptos para el uso alimentario en los que la función de la EI es completa o parcialmente perjudicada. Este procedimiento comprende:

- transformar la *L. casei* con un vector integrativo que comprende un gen *ptsI* mutado, y que comprende, además, un gen marcador selectivo;

- cultivar las bacterias bajo condiciones selectivas para el gen marcador (por ejemplo, si el gen marcador es un gen de resistencia antibiótica, en presencia del antibiótico correspondiente) y recuperando las bacterias capaces de crecer en estas condiciones, es decir, las que han integrado el vector en su cromosoma mediante un evento de recombinación simple;

- cultivar dichas bacterias bajo condiciones no selectivas para el gen marcador con el fin de obtener bacterias que han experimentado un evento de recombinación doble que lleva a la escisión de las secuencias del vector.

Este evento de recombinación doble produce bacterias que presentan un fenotipo de tipo salvaje y bacterias que presentan la mutación deseada. A continuación, estas últimas pueden ser filtradas en base a sus propiedades fenotípicas, y/o mediante amplificación PCR de la región cromosómica a la que iba dirigida la mutación y el análisis de los productos de amplificación (por ejemplo, comparación de los perfiles de restricción). La presencia de la mutación deseada puede además ser confirmada mediante secuenciación de ADN.

Las cepas mutantes de la invención pueden también obtenerse a partir de cepas de tipo salvaje de la *L. casei* mediante procedimientos de mutación clásicos, por ejemplo, mediante mutagénesis inducida químicamente o por medio de radiación ultravioleta. Pueden ser también mutantes naturales aislados de las poblaciones de *L. casei*.

Por ejemplo, las cepas mutantes de la invención pueden ser seleccionadas en base a sus propiedades metabólicas. Por ejemplo, los mutantes en el gen *ptsI* pueden seleccionarse en base a su resistencia a la 2-deoxiglucosa. Los mutantes en el gen *ptsI* que presentan una EI inactiva pueden también seleccionarse en base a su capacidad de crecimiento en azúcar no PTS pero no en azúcares PTS.

La invención también proporciona un procedimiento para la preparación de productos alimenticios o aditivos alimenticios en el que dicho procedimiento comprende la fermentación de un sustrato alimenticio con una cepa mutante de la *L. casei*, tal como se ha definido anteriormente.

Según una forma de realización preferente del procedimiento de la invención, el producto alimenticio obtenido presenta una textura y un sabor mejorados.

Preferentemente, dicho producto alimenticio es un producto láctico.

Según una forma de realización particular, el procedimiento de la invención comprende la preparación de un producto alimenticio enriquecido con compuestos de aroma (tales como acetato, acetoina, diacetil, hidroxí-3-pentanona, propionato) mediante la fermentación de un sustrato alimenticio con una cepa de *L. casei* que presenta una mutación adicional que perjudica la función de CcpA.

Los mutantes del gen *ccpA* de la *L. casei* [Monedero *et al.*, J. Bacteriol., 179, 6657-6664, (1997)] son ya conocidos en la técnica. No son mutantes aptos para uso alimentario, pero el experto en la materia puede obtener fácilmente mutantes de *ccpA* aptos para uso alimentario mediante los mismos procedimientos descritos anteriormente para la obtención de los mutantes de *ptsI* aptos para uso alimentario.

La invención también proporciona productos alimenticios fermentados que pueden obtenerse mediante el procedimiento de la invención y, particularmente, productos alimenticios fermentados que comprenden por lo menos una cepa mutante de *L. casei*, tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante la descripción adicional que sigue a continuación, que hace referencia a los ejemplos de construcción y a la utilización de las cepas mutantes de la *L. casei* de la invención. Sin embargo, debería entenderse que estos ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración de la invención y no constituyen, en manera alguna, una limitación de la misma.

Ejemplo 1

Caracterización de los genes ptsH y ptsI de la L. casei

Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas y los plásmidos de la *L. casei* utilizados para la caracterización de los genes *ptsH* y *ptsI* y la construcción de los mutantes de *ptsI* se muestran en la Tabla 1a y 1b a continuación.

TABLA 1a

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
(<i>L. casei</i>)		
BL23	Tipo salvaje	Bruce Chassy
BL30	<i>man</i>	(Veyrat <i>et al.</i> , 1994)
BL71	<i>ccpA</i>	(Monedero <i>et al.</i> , 1997)
BL72	<i>Man ccpA</i>	(Gosalbes <i>et al.</i> , 1997)
BL124	<i>ptsI</i> : pVME800	Esta memoria
BL126	<i>ptsI</i> 1 (cambio de marco de lectura introducido en la primera posición <i>EcoRI</i> de <i>ptsI</i>)	Esta memoria

TABLA 1b

PLÁSMIDO	PROPIEDADES	ORIGEN
pUC18		Pharmacia-Biotech
pRV300	pBluescript SK con el gen pAM β 1 EmR	(Leloup <i>et al.</i> , 1997)
pUCR-HI	pUC18 con un fragmento PCR de 1,6 kb con parte de <i>ptsH</i> y <i>ptsI</i>	Esta memoria
pVME800	pRV300 con un fragmento <i>EcoRI</i> de 865 pb con parte interna de <i>ptsI</i>	Esta memoria
pVMS1	pRV300 con un fragmento de 9kb a continuación de <i>ptsI</i>	Esta memoria
pVMH1	pRV300 con parte de <i>ptsI</i> , <i>ptsH</i> completo y 105 pb a continuación de <i>ptsH</i>	Esta memoria
pVMR10	Derivado de pVMH1 con un cambio en el marco de lec- tura en la primera posición <i>EcoRI</i> de <i>ptsI</i>	Esta memoria

Las células de *L. casei* se cultivaron a 37°C bajo condiciones estáticas en un medio MRS (Oxoid) o un medio de fermentación MRS (Adsa-Micro, Scharlau S.A., Barcelona, España) que contiene 0,5% de los carbohidratos indicados.

Para los experimentos de crecimiento diauxico, las cepas de *L. casei* se cultivaron en un medio basal MRS que contiene 1 l: polipeptona (Difco), 10 g; extracto de carne (Difco), 10 g; extracto de levadura (Difco), 5 g; K₂HPO₄·3H₂O, 2 g; acetato de sodio, 5 g; citrato de amonio, 2 g; MgSO₄, 0,1 g; MnSO₄, 0,05 g y Tween 80, 1 ml. El medio basal se suplementó con diversos azúcares a una concentración final de 0,5%, pero para los experimentos de crecimiento diauxico las concentraciones de azúcar se modificaron, tal como se indica en el texto. La *E. coli* DH5 α se cultivó con agitación a 37°C en un medio Luria-Bertani (LB). Las bacterias transformadas se depositaron en los medios sólidos respectivos que contienen 1,5% de agar. Las concentraciones de antibióticos utilizadas para la selección de los transformantes de *E. coli* eran de 100 μ g por ml de ampicilina, y 300 μ g por ml de eritromicina y para la selección de los integrantes de la *L. casei* 5 μ g por ml de eritromicina. El patrón de utilización de azúcar de ciertas cepas se determinó con las galerías API50-CH (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Purificación de HPr

Las células de un cultivo, realizado durante la noche, (1 l de medio RMS) fueron centrifugadas y lavadas dos veces con Tris-HCl 20 mM, pH 7,4. Las células fueron resuspendidas en tampón de bicarbonato de amonio 20 mM, pH 8 (2 ml por gramo de sedimento celular), fueron sonicadas (Branson Sonifier 250) y a continuación fueron centrifugadas para eliminar los restos celulares. Debido a que HPr resiste los tratamientos por calor, el sobrenadante se mantuvo a 70°C durante 5 minutos para precipitar la mayor parte de las otras proteínas. Se realizó una etapa de centrifugación adicional para eliminar las proteínas desnaturalizadas por el calor. El sobrenadante se cargó en una columna Sephadex G-75 (42 cm x 1,6 cm) equilibrada con bicarbonato de amonio 20 mM, pH 8, diluido con el mismo tampón, y se recogieron fracciones de 1,5 ml. Para realizar un ensayo para la presencia de HPr en estas fracciones, se llevó a cabo un ensayo de complementación mutante con la cepa S797A de *ptsH* de la *S. aureus* [Hengstenberg *et al.*, J. Bacteriol., 99, 383-388, (1969)]. Se detectó actividad HPr en las fracciones 48 a 56. Estas fracciones se unieron y se concentraron a un volumen final de 500 μ l.

Se separó la mitad de la HPr, parcialmente purificada, mediante cromatografía de fase inversa en una columna Vydac C-18 HPLC (300 Å, 250 mm x 4, mm; Touzart et Matignon, Francia). El solvente A era una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% v/v y el solvente B contenía 80% de acetonitrilo y 0,04% de ácido trifluoroacético. Las proteínas se diluyeron con un gradiente lineal de 5% a 100% del solvente B en 60 minutos a un flujo de 500 µl/minuto. Se recogieron, manualmente, fracciones con un volumen aproximado de 500 µl. Se ensayó para la presencia de HPr en las fracciones mediante un ensayo de fosforilación, dependiente de PEP, que contenía MgCl₂ 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 10 µl de alícuotas de las fracciones, [³²P]PEP 10 µM y 1,5 µg de enzima *B. subtilis* I(His)₆. Las enzimas I(His)₆ y HPr(His)₆ de la *B. subtilis* se purificaron mediante una cromatografía iónica en una columna Ni-NTA Sepharose (Qiagen) después de la expresión a partir de los plásmidos pAG3 y pAG2, respectivamente [Galinier *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 8439-8444, (1997)]. HPr(His)₆ de *B. subtilis* se utilizó como estándar en las reacciones de fosforilación. [³²P]PEP se preparó a partir de γ-[³²P]ATP mediante la reacción de intercambio de piruvato kinasa [Roossien *et al.*, Biochim. Biophys. Acta., 760, 185-187, (1983)]. Las mezclas de ensayo fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C y fueron separadas en geles de poliacrilamida al 15% que contienen 1% de SDS [Laemmli, Nature, 227, 680-685, (1970)]. Después del secado de los geles, se detectaron las proteínas radiomarcadas mediante una autorradiografía. Se encontró HPr diluido en acetonitrilo al 60% en las fracciones 44 a 46. Estas fracciones se unieron, se liofilizaron y se utilizaron alícuotas correspondientes a aproximadamente 0,5 nmol de HPr para determinar los 21 primeros aminoácidos N-terminales de la HPr mediante degradación automatizada de Edman en un dispositivo microsecuenciador 473A Applied Biosystems.

Clonación de los fragmentos de *ptsHI* de la *L. casei* amplificados mediante PCR

Para amplificar fragmentos de ADN de la *L. casei* que contienen *ptsH* y parte de *ptsI*, los siguientes oligonucleótidos degenerados fueron diseñados en base a la secuencia N-terminal de la HPr y a las regiones fuertemente conservadas en la enzima I, que se detectaron llevando a cabo un alineamiento de diferentes secuencias de la enzima I:

PTS-H2 (5'-ATG GAA AAR CGN GAR TTY AAY-3') (MEKREFN);

PTS-I3 (5'-GCC ATN GTR TAY TGR ATY ARR TCR TT-3') (NDLIQYTMA);

PTS-I4 (5'-CCR TCN SAN GCN GCR ATN CC-3') (GIAASDG);

donde R se refiere a A o G, Y se refiere a C o T, S se refiere a C o G y N se refiere a cualquier oligonucleótido. Se muestran subrayados y en paréntesis la secuencia de aminoácidos N-terminal de la HPr y las secuencias conservadas de la enzima I que sirvieron para diseñar los cebadores.

La amplificación PCR de los dos fragmentos que comprenden parte del operón *ptsHI* se realizó con un dispositivo termociclador Progene (Real, S.L., España) programado para 30 ciclos que incluían los tres etapas siguientes: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C, seguido de un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Dos combinaciones de cebadores (PTS-H2/PTS-I3 y PTS-H2/PTS-I4) proporcionaron fragmentos amplificados por PCR de 1,6 kb y 0,3 kb, respectivamente. La secuenciación de los productos de la PCR reveló que las secuencias de aminoácidos deducidas presentaron una fuerte similitud con las secuencias de las enzimas I y HPr conocidas. Como se esperaba, ambos fragmentos de ADN empezaban con el extremo 5' de *ptsH* y se extendían a la región *ptsI* codificadora de la secuencia conservada elegida como base para el segundo cebador. El mayor de los dos fragmentos obtenidos con el cebador PTS-I3 fue clonado a pUC18, proporcionando un plásmido pUCR-H1. La clonación de los fragmentos de PCR se llevó a cabo con el Kit de Sureclone Ligation (Pharmacia Biotech, Ltd., Uppsala, Suiza).

Un fragmento *EcoRI* de 865 pb que contenía una parte interna del gen *ptsI* fue obtenido a partir del plásmido pUCR-H1 y fue subclonado en el vector suicida pRV300 [Leloup *et al.*, Appl. Environm. Microbiol., 63, 2117-2123, (1997)], proporcionando el plásmido pVME800.

Este plásmido fue utilizado para transformar la cepa BL23 de tipo salvaje de la *L. casei*, y la integración del plásmido en la posición correcta (*ptsI*::pVME800) se verificó mediante PCR y transferencia southern.

El análisis de la restricción de la región *ptsHI* fue llevado a cabo mediante hibridación Southern utilizando ADN aislado a partir de un integrante (BL124) con el propósito de identificar las enzimas de restricción que permiten la clonación de los genes *ptsH* y *ptsI* conjuntamente con sus regiones flanqueadoras.

La clonación de las regiones flanqueadoras de la posición de inserción del plásmido pRV300 se llevó a cabo de la manera siguiente: ADN (10 µg) de la cepa BL124 de la *L. casei* se digirió con *SacI* o *HindIII*, se diluyó 500 veces, se religó con T4 ADN ligasa y se utilizaron diferentes alícuotas para transformar *E. coli* DH5α. El ADN plásmido se aisló a partir de varios transformantes y a continuación se secuenció.

La digestión del ADN de la B124 con *SacI* y la religación de los fragmentos de ADN obtenidos permitió aislar el plásmido pVMS1, que contiene una inserción de aproximadamente 9kb. La secuenciación parcial de esta inserción reveló que contenía la parte 3' de *ptsI* y su región a continuación. El mismo experimento llevado a cabo con *HindIII*

permitió aislar el plásmido pVMH1 que contiene una inserción de 2,4 kb que comprende el gen *ptsH* completo junto con parte de su región promotora y la parte 5' de *ptsI*.

La secuencia que contiene el promotor *ptsH* completo y 560 pb de la región a continuación del mismo se obtuvo posteriormente, mediante PCR inversa. Para este propósito, el ADN aislado a partir de la cepa BL23 de tipo salvaje de la *L. casei* se cortó con PstI y se religó con T4 ADN ligasa (Gibco-BRL). 20 ng del ADN ligado y dos cebadores derivados a partir de la parte 5' de *ptsH* y orientados en direcciones opuestas se utilizaron para amplificar específicamente mediante PCR un fragmento de 2,3 kb que contenía la región anterior de *ptsH*. La secuencia que comprende 560 pb anteriores al promotor de *ptsHI* ha sido determinada en este fragmento.

En total, se ha secuenciado un tramo continuo de 4.150 pb. Contenía los genes *ptsH* y *ptsI* completos y un marco abierto de lectura (ORF) situado a continuación de *ptsI*. El codón de stop de *ptsH* solapaba el codón de inicio de *ptsI* por 1 pb, sugiriendo que estos dos genes están organizados en un operón. Mientras que HPr y la enzima I codificados de la *L. casei* presentaban similitudes de secuencia en el intervalo de 65% a 85% cuando se compararon con sus homólogos en *B. subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *Streptococcus salivarius* o *Enterococcus faecalis*, la proteína codificada por el ORF situado a continuación de *ptsI* presentaba similitud a las permeasas de azúcar XyIE [Davis y Henderson, J. Biol. Chem., 262, 13928-13932, (1987)] y GalP [Pao *et al.*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 1-34, (1998)] de *Escherichia coli*. No se pudo detectar un ORF en la región de 560 pb a continuación del promotor *ptsHI*.

La Figura 1 es una representación esquemática del fragmento de ADN de la *L. casei* cromosomal secuenciado que contiene el operón *ptsHI*. Se indican los tres ORF detectados en este fragmento, el promotor y el terminador del operón *ptsHI* y diversas posiciones de restricción importantes. Los fragmentos de PCR inicialmente aislados, H2/I4 y H2/I3 (flanqueados por flechas enfrentadas) y el fragmento de *EcoRI* de 865 pb, que se denominó E800 y se subclonó en pRV300, se muestran en la parte superior de la presentación esquemática del fragmento de ADN total.

Análisis transcripcional del operón *ptsHI* de la *L. casei*

Para determinar el tamaño de las transcripciones *ptsHI* y para comprobar el efecto de un *man* (inhibe el consumo de glucosa mediante el sistema TPS) y una mutación de *ccpA* sobre la expresión de *ptsHI*, se realizaron transferencias Northern con el ARN aislado no sólo a partir de la cepa BL23 de tipo salvaje de la *L. casei*, sino también a partir de las cepas mutantes BL30 (*man*) [Veyrat *et al.*, Microbiology, 140, 1141-1149, (1994)], BL71 (*ccpA*) [Monedero *et al.*, J. Bacteriol., 179, 6657-6664, (1997)] y BL72 (*man ccpA*) [Gosalbes *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 148, 83-89, (1997)], que se cultivaron en un medio que contenía glucosa, lactosa o ribosa.

Las cepas de *L. casei* se cultivaron en un medio de fermentación MRS suplementado con 0,5% de diferentes azúcares a un OD a 550 nm comprendido en el intervalo de 0,8 a 1. Las células de un cultivo de 10 ml se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con EDTA 50 mM y se resuspendieron 1 ml de Trizol (Gibco Brl.). Se añadieron 1 g de perlas de cristal (diámetro 0,1 mm) y las células se rompieron mediante agitación de la suspensión celular en un dispositivo Fastprep (Biospec, Bartlesville, OK, USA) dos veces durante 45 segundos. El ARN fue aislado según el procedimiento recomendado por el fabricante de Trizol, fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa formaldehído y transferido a unas membranas Hybond-N (Amersham).

Los experimentos de hibridación se llevaron a cabo con sondas *ptsH* específicas o *ptsI* específicas. Con ambas sondas, pudo detectarse una banda de ARNm de aproximadamente 2,1 kb, que se encuentra en buena concordancia con el tamaño esperado para los genes *ptsH* y *ptsI* combinados, confirmando que estos dos genes se encuentran organizados en un operón y que la transcripción termina en la estructura tallo-bucle situada a continuación de *ptsI*.

Las mediciones densitométricas de las bandas de hibridación en el ARN aislado a partir de las células de los diferentes mutantes cultivados en un medio que contenía glucosa, lactosa o ribosa mostraron que la expresión del operón *ptsHI* era moderadamente inducida mediante la glucosa en el tipo salvaje y en el mutante *ccpA*, mientras que este efecto era menos pronunciado en las cepas con la mutación *man*.

Ejemplo 2

Construcción y caracterización de los mutantes *ptsI*

Mutante BL124

Este mutante es el resultado de la transformación de la cepa BL23 de tipo salvaje de la *L. casei* con el plásmido pVME800, tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Al contrario que la cepa de tipo salvaje, este mutante ya no puede producir ácido a partir de fructosa, manosa, manitol, sorbosa, sorbitol, amigdalina, arbutina, salicina, celobiosa, lactosa, tagatosa, trehalosa y turanosa. Sin embargo, todavía puede metabolizar ribosa, galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, aesculina, maltosa y gluconato, sugiriendo que en la *L. casei* existen sistemas de transporte independientes del sistema PTS para esta segunda clase de azúcares.

Mutante BL126

El plásmido pVMH1 fue parcialmente digerido con EcoRI y fue convertido en extremo romo (rellenado con el fragmento Klenow) antes de que fuera religado y utilizado para transformar *E. coli* DH5 α . A partir de uno de los transformantes resultantes pudo ser aislado un plásmido (pVMR10), que presentaba una mutación de cambio en el marco de lectura en la posición de EcoRI situada en el nucleótido 327 del gen *ptsI*, tal como fue confirmado mediante un análisis de restricción y secuenciación de ADN (inserción de 4 pares de bases adicionales). El plásmido pVMR10 fue posteriormente utilizado para transformar la cepa BL23 de la *L. casei* y un integrante *ptsI** resistente a la eritromicina resultante de una recombinación tipo Campbell fue aislado.

A partir de esta cepa, pudo obtenerse un mutante *ptsI* (*ptsI1*, BL126) mediante una segunda recombinación. BL126 era sensible a la eritromicina y presentaba un patrón de fermentación idéntico al encontrado para el mutante *ptsI*::pVME800 de la BL124. De manera interesante, no pudo detectarse ARNm de *ptsHI* en BL126 mediante una transferencia Northern.

Ejemplo 3

*Construcción y caracterización de mutantes *ptsI* aptos para uso alimentario*

Un mutante apto para uso alimentario de los genes *ptsI* fue construido en la cepa industrial de la *L. paracasei*, subespecie *paracasei* CNCM I-1518; esta cepa se da a conocer en EP 0794707.

Este mutante se construyó utilizando el procedimiento del Ejemplo 2.

El plásmido pVMR10 se utilizó para transformar *L. casei* CNCM I-1518.

La cepa transformada fue cultivada en medio MRS que comprende 5 μ g/ml de eritromicina. Se aisló un integrante *ptsI** resistente a la eritromicina. Este integrante se cultivó durante 200 generaciones en medio MRS sin eritromicina para permitir la segunda recombinación que lleva a la escisión del plásmido pVMR10.

Se aisló un clon de Lac⁻ sensible a la eritromicina, tal como se explica en el Ejemplo 2 anteriormente, se comprobó mediante PCR y se secuenció su gen *ptsI*. El patrón de fermentación de este clon en API-CH50L mostró que, cuando se compara con el tipo salvaje CNCM I-1518, este mutante ya no podía utilizar adonitol, fructosa, manosa, sorbosa, manitol, sorbitol, amigdalina, arbutina, salicina, cellobiosa, sucrosa ni trehalosa.

Este mutante se cultivó a 37°C en leche de poca grasa (13 g grasa/kg) o leche desnatada. En leche desnatada, se alcanzó un pH de 4,45 después de 34 horas (bajo las mismas condiciones se alcanzó un pH de 4,45 después de 30 horas con la cepa de tipo salvaje CNCM I-1518).

En otra serie de ensayos, se utilizó leche desnatada con 170 g proteína/kg, 13 g grasa/kg y suplementada con 50 g de glucosa/kg.

Los productos fermentados obtenidos a partir de leche estándar suplementada con glucosa con la cepa mutante *ptsI* presentan una fuerza de gel inferior en un valor de aproximadamente 15% a 25% que los productos fermentados obtenidos a partir de la cepa de tipo salvaje. Esto permite obtener un gel más elástico, en aproximadamente 15% a 25%, y reducir la sinéresis.

También presentan una viscosidad levemente inferior que los productos fermentados obtenidos con la cepa de tipo salvaje. Sin embargo, la pérdida de viscosidad bajo condiciones de cizallamiento es menos importante en el caso de los productos obtenidos con la cepa mutante. Esta propiedad permite una mejor conservación de la textura durante los procesos industriales en los que pueden ocurrir cizallamientos, tales como la preparación de leche fermentada agitada.

Los productos fermentados obtenidos con la cepa mutante presentaban un sabor más cremoso que los productos obtenidos con la cepa de tipo salvaje. Esto está relacionado con un mayor contenido de ácidos grasos C4, C6, C8, C12, C14 y C16.

Ejemplo 4

*Propiedades de postacidificación del mutante *ptsI* apto para uso alimentario*

El mutante de *ptsI* del Ejemplo 3 se cultivó tal como se ha descrito anteriormente en leche estándar suplementada con glucosa hasta un pH de aproximadamente 4,55.

Las leches fermentadas obtenidas de esta manera se almacenan a 4°C, 8°C o 13°C y el pH es medido después de 7, 14, 21 o 28 días de almacenamiento.

La Figura 2 representa la postacidificación durante el almacenamiento a diferentes temperaturas para las leches fermentadas obtenidas con la cepa de tipo salvaje o con el mutante *ptsI*.

ES 2 278 737 T3

Leyenda de la Figura 2:

-●- : cepa tipo salvaje, 4°C

-▲- : cepa tipo salvaje, 8°C

-◆- : cepa tipo salvaje, 13°C

-●- : mutante *ptsI*, 4°C

-▲- : mutante *ptsI*, 8°C

-◆- : mutante *ptsI*, 13°C

Estos resultados muestran que en todos los casos, el mutante *ptsI* presenta una postacidificación reducida en comparación con la cepa de tipo salvaje.

Esta postacidificación reducida no es debida a una tasa de supervivencia inferior de la cepa mutante. Esto se controló mediante la medición de la tasa de supervivencia a los 28 días. Esta tasa es superior al 60% para el mutante *ptsI*, así como para la cepa de tipo salvaje.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un mutante de *L. casei* que presenta por lo menos una mutación en el gen *ptsI*, en la que dicha mutación perjudica la regulación de un mecanismo de represión catabólica por carbono (CCR) que implica la proteína PTS HPr, para la preparación de un producto alimenticio.

2. Utilización según la reivindicación 1 en la que dicha mutación en el gen *ptsI* perjudica la capacidad de la EI para fosforilar la HPr.

3. Utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que dicho mutante presenta por lo menos una mutación en el gen *ptsI* que resulta en la expresión de una proteína EI desprovista de por lo menos los aminoácidos desde el 110 al 574 de la EI de tipo salvaje.

4. Mutante de *L. casei* que presenta por lo menos una mutación en por lo menos un gen *ptsI* en el que dicha mutación perjudica por lo menos una de las funciones del producto de dicho gen.

5. Mutante de *L. casei* apto para uso alimentario que presenta por lo menos una mutación en el gen *ptsI* en el que dicha mutación perjudica por lo menos una de las funciones del producto de dicho gen.

6. Procedimiento para la obtención de un mutante apto para el uso alimentario según la reivindicación 5 en el que dicho procedimiento comprende:

- transformar la *L. casei* con un vector integrativo que comprende un gen *ptsI* mutado, en el que dicha mutación perjudica por lo menos una de las funciones del producto de dicho gen y que comprende, además, un gen marcador selectivo;

- cultivar las bacterias bajo condiciones selectivas para el gen marcador con el fin de obtener las bacterias que han integrado el plásmido en su cromosoma mediante un evento de recombinación simple;

- cultivar dichas bacterias bajo condiciones no selectivas para el gen marcador con el fin de obtener bacterias que han experimentado un evento de recombinación doble que lleva a la escisión de las secuencias del vector.

7. Procedimiento para la preparación de un producto alimenticio o un aditivo alimenticio en el que dicho procedimiento comprende la fermentación de un sustrato de alimento con un mutante de *L. casei*, tal como se ha definido en las reivindicaciones 1 a 5.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 en el que dicho producto alimenticio es un producto láctico.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para la preparación de productos alimenticios enriquecidos con compuestos de aroma, que comprende la fermentación de un sustrato de alimento con una cepa de *L. casei* que presenta una mutación que perjudica la función de CcpA.

10. Producto alimenticio fermentado que comprende por lo menos un mutante de *L. casei*, tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

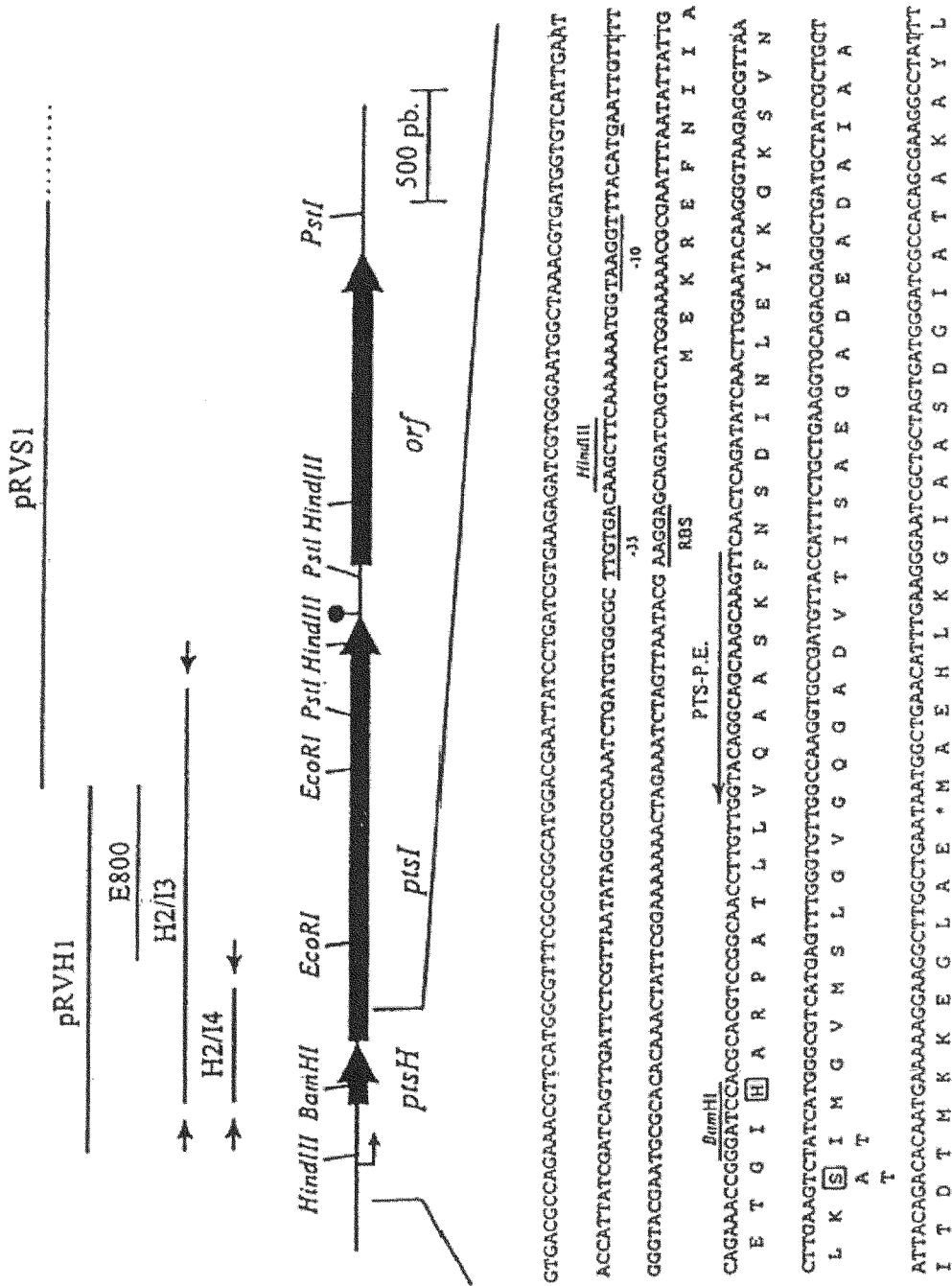


Figure 1

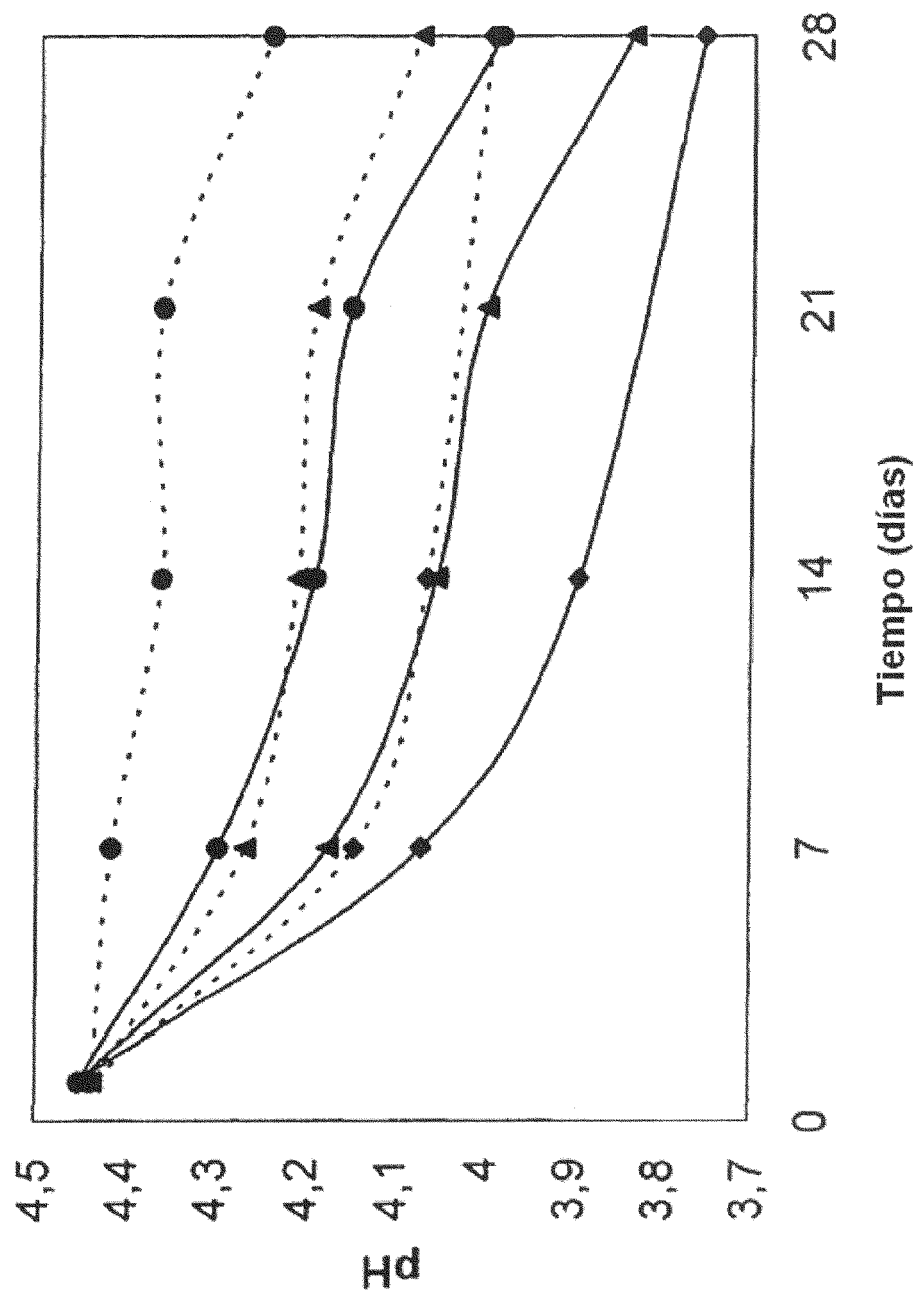


Figura 2

ES 2 278 737 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CNRS
 CSIC
 5 COMPAGNIE GERVAIS DANONE
 DEUTSCHER, Josef
 PEREZ MARTINEZ, Gaspar
 MONEDERO GARCIA, Vicente
 10 VIANA BALLESTER, Rosa
 BENBADIS, Laurent
 PIERSON, Anne
 FAURIE, Jean-Michel

15 <120> MUTANTES DE *LACTOBACILLUS CASEI* CON REGULACIÓN DEFECTUOSA DEL CATABOLISMO DEL CARBONO
 <130> MJPcb191-171
 <140>
 20 <141>
 <150> EP 00400894.2
 <151> 2000-03-31
 25 <160> 3
 <170> PatentIn Ver.2.1
 30 <210> 1
 <211> 4150
 <212> ADN
 35 <213> *Lactobacillus casei*
 <220>
 <221> CDS
 40 <222> (273)..(536)
 <223> Producto: Hpr
 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (539)..(2263)
 <223> Producto: Enzima I
 <400> 1
 50

```

gtgacgccag aaacggttcac ggcgttttcgc ggggcattgga cgaattatcc tgatcgtgaa 60
gagatcgtgg gaatggctaa acgtgatggt gtcattgaat accattatcg atcagttgat 120
55 tctcgttaat ataggcgcca aatctgatgt ggcgcttggtg acaagcttca aaaaatggta 180
agggtttacat gaattgtttt gggtacgaat gcgcacacaa actattcgga aaaaaactag 240
60 aaatctagtt aatacgaagg agcagatcag tc atg gaa aaa cgc gaa ttt aat 293
Met Glu Lys Arg Glu Phe Asn
1 5
65 att att gca gaa acc ggg atc cac gca cgt ccg gca acc ttg ttg gta 341
Ile Ile Ala Glu Thr Gly Ile His Ala Arg Pro Ala Thr Leu Leu Val
10 15 20
  
```

ES 2 278 737 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

cag gca gca agc aag ttc aac tca gat atc aac ttg gaa tac aag ggt 389
 Gln Ala Ala Ser Lys Phe Asn Ser Asp Ile Asn Leu Glu Tyr Lys Gly
 25 30 35
 aag agc gtt aac ttg aag tct atc atg ggc gtc atg agt ttg ggt gtt 437
 Lys Ser Val Asn Leu Lys Ser Ile Met Gly Val Met Ser Leu Gly Val
 40 45 50 55
 ggc caa ggt gcc gat gtt acc att tct gct gaa ggt gca gac gag gct 485
 Gly Gln Gly Ala Asp Val Thr Ile Ser Ala Glu Gly Ala Asp Glu Ala
 60 65 70
 gat gct atc gct gct att aca gac aca atg aaa aag gaa ggc ttg gct 533
 Asp Ala Ile Ala Ala Ile Thr Asp Thr Met Lys Lys Glu Gly Leu Ala
 75 80 85
 gaa ta atg gct gaa cat ttg aag gga atc gct gct agt gat ggg atc 580
 Glu Met Ala Glu His Leu Lys Gly Ile Ala Ala Ser Asp Gly Ile
 90 95 100
 gcc aca gcg aag gcc tat tta ctg gtt caa cct gat ttg tca ttc caa 628
 Ala Thr Ala Lys Ala Tyr Leu Leu Val Gln Pro Asp Leu Ser Phe Gln
 105 110 115
 aaa aag acg gtt gat gat cct tca aag gaa atc gat cgc ctg aag cag 676
 Lys Lys Thr Val Asp Asp Pro Ser Lys Glu Ile Asp Arg Leu Lys Gln
 120 125 130
 tca ctt gat caa agt aat gat gag tta aag gtt att cga gca aag gcc 724
 Ser Leu Asp Gln Ser Asn Asp Glu Leu Lys Val Ile Arg Ala Lys Ala
 135 140 145 150
 gct gaa tcg ctt ggc gaa gaa gag gct cag gtt ttt gat gcg cac atg 772
 Ala Glu Ser Leu Gly Glu Glu Glu Ala Gln Val Phe Asp Ala His Met
 155 160 165
 atg att ttg gct gat cct gac ttt act ggt cag gta gag act aag atc 820
 Met Ile Leu Ala Asp Pro Asp Phe Thr Gly Gln Val Glu Thr Lys Ile
 170 175 180
 aag gat gaa aaa gtc aat gct gag cag gct ttg aaa gaa gtc tcc gaa 868
 Lys Asp Glu Lys Val Asn Ala Glu Gln Ala Leu Lys Glu Val Ser Glu
 185 190 195
 ttc ttt att aag aca ttc gaa ggt atg acc gac aat cca tat atg cag 916
 Phe Phe Ile Lys Thr Phe Glu Gly Met Thr Asp Asn Pro Tyr Met Gln
 200 205 210
 gaa cgt gcg gct gat gtc cgc gac gtg aca aag cgg atc atg gca cac 964
 Glu Arg Ala Ala Asp Val Arg Asp Val Thr Lys Arg Ile Met Ala His
 215 220 225 230
 ttg ctc ggt cgc aat ttg cca aat cca gca tta att gat gaa gaa gtc 1012
 Leu Leu Gly Arg Asn Leu Pro Asn Pro Ala Leu Ile Asp Glu Glu Val
 235 240 245

ES 2 278 737 T3

	gtt gtg gtt gcg cat gac ctg acc cct tcg gat acc gca caa ttg aat	1060
	Val Val Val Ala His Asp Leu Thr Pro Ser Asp Thr Ala Gln Leu Asn	
	250 255 260	
5	aag aag tat gtc aaa gca ttt gtc acg gat att ggc ggt cgg act gcg	1108
	Lys Lys Tyr Val Lys Ala Phe Val Thr Asp Ile Gly Gly Arg Thr Ala	
	265 270 275	
10	cac agt gcg att atg gca cgt tcg ttg gaa att ccg gct gtt gtt ggg	1156
	His Ser Ala Ile Met Ala Arg Ser Leu Glu Ile Pro Ala Val Val Gly	
	280 285 290	
15	aca gat gac att acc aag aag gct aat aac ggt gat ctt att tcc gtt	1204
	Thr Asp Asp Ile Thr Lys Lys Ala Asn Asn Gly Asp Leu Ile Ser Val	
	295 300 305 310	
20	gat ggc tta act ggt gaa gtt gtt gtt gat ccg acc gat gat gaa gta	1252
	Asp Gly Leu Thr Gly Glu Val Val Val Asp Pro Thr Asp Asp Glu Val	
	315 320 325	
25	gct aag ttc aag cag gat gct gaa gca ttt gct aag caa aaa gct gaa	1300
	Ala Lys Phe Lys Gln Asp Ala Glu Ala Phe Ala Lys Gln Lys Ala Glu	
	330 335 340	
30	tgg gct ctt ttg aag acg gcc aaa tca atc aca gct gat ggc aaa cac	1348
	Trp Ala Leu Leu Lys Thr Ala Lys Ser Ile Thr Ala Asp Gly Lys His	
	345 350 355	
35	ttt gat gtt gct gcc aac atc ggc acg cca aag gat ctt gat ggt gtg	1396
	Phe Asp Val Ala Ala Asn Ile Gly Thr Pro Lys Asp Leu Asp Gly Val	
	360 365 370	
40	ctg gca aac ggt gct gaa ggt atc ggt ttg tat cgg aca gag ttc ttg	1444
	Leu Ala Asn Gly Ala Glu Gly Ile Gly Leu Tyr Arg Thr Glu Phe Leu	
	375 380 385 390	
45	tac atg gat tct gct gaa tta ccg acc gaa gac gat caa ttc gag gcc	1492
	Tyr Met Asp Ser Ala Glu Leu Pro Thr Glu Asp Asp Gln Phe Glu Ala	
	395 400 405	
50	tac aag aag gtt gtc gaa acg atg agt ccg aag cct gtt gtt gtt cgg	1540
	Tyr Lys Lys Val Val Glu Thr Met Ser Pro Lys Pro Val Val Val Arg	
	410 415 420	
55	acg atg gat att ggt ggg gat aaa cat ctg cca tat ttg cca ctt cct	1588
	Thr Met Asp Ile Gly Gly Asp Lys His Leu Pro Tyr Leu Pro Leu Pro	
	425 430 435	
60	gat cgc caa gat atc ttc cgg aca cag ttg cgc gcc ttg ttg cgt gca	1636
	Asp Arg Gln Asp Ile Phe Arg Thr Gln Leu Arg Ala Leu Leu Arg Ala	
	440 445 450 455	
65	tct gcc ttt ggc aat ctg cgg atc atg ttc cct atg att gct acc att	1684
	Ser Ala Phe Gly Asn Leu Arg Ile Met Phe Pro Met Ile Ala Thr Ile	
	460 465 470 475 480 485	

ES 2 278 737 T3

5 gct gaa ttc aag caa gca agg cag att ttc act gaa gaa aaa gat aag 1780
 Ala Glu Phe Lys Gln Ala Arg Gln Ile Phe Thr Glu Glu Lys Asp Lys
 490 495 500
 tta gtc aag gat ggc gtc aaa gta tct gat gat atc caa ctt ggc att 1828
 Leu Val Lys Asp Gly Val Lys Val Ser Asp Asp Ile Gln Leu Gly Ile
 505 510 515
 10 atg atc gaa att cct gca gct gca gtt ttg gct gat cag ttt gct aag 1876
 Met Ile Glu Ile Pro Ala Ala Ala Val Leu Ala Asp Gln Phe Ala Lys
 520 525 530
 15 tat gtt gac ttc ttc tcc att ggt aca aat gac ttg atc cag tac tct 1924
 Tyr Val Asp Phe Phe Ser Ile Gly Thr Asn Asp Leu Ile Gln Tyr Ser
 535 540 545 550
 20 atg gcc gct gat cgt ggg aac gag cat gtt tcc tac ctg tat cag cca 1972
 Met Ala Ala Asp Arg Gly Asn Glu His Val Ser Tyr Leu Tyr Gln Pro
 555 560 565
 25 tac aac cca tcc atc ctt cgc cta atc aag cac gtg att gat tcg gca 2020
 Tyr Asn Pro Ser Ile Leu Arg Leu Ile Lys His Val Ile Asp Ser Ala
 570 575 580
 30 cat aag gaa ggc aag tgg gcc ggt atg tgt ggc gaa gct gct ggt gat 2068
 His Lys Glu Gly Lys Trp Ala Gly Met Cys Gly Glu Ala Ala Gly Asp
 585 590 595
 35 cca atc atg gta cca ctg ttg ctt ggt atg ggt ctt gac gaa tac tca 2116
 Pro Ile Met Val Pro Leu Leu Leu Gly Met Gly Leu Asp Glu Tyr Ser
 600 605 610
 40 atg tcc gca act tct gtc ctt aaa gta cgc agc ttg atg aag aag ctt 2164
 Met Ser Ala Thr Ser Val Leu Lys Val Arg Ser Leu Met Lys Lys Leu
 615 620 625 630
 45 tcg aca gct gat atg gct aag atg gac gaa att gct ttg aac caa aat 2212
 Ser Thr Ala Asp Met Ala Lys Met Asp Glu Ile Ala Leu Asn Gln Asn
 635 640 645
 50 atc act aat gat gaa aac gct gat ctg gtt aag aaa aca act ggt cag 2260
 Ile Thr Asn Asp Glu Asn Ala Asp Leu Val Lys Lys Thr Thr Gly Gln
 650 655 660
 aaa taaactttca ttatcagaaa gagtctattg actgaataag ttgacggctt 2313
 Lys
 ctttttttga ccaaaatttg attttgatcg tgctcgctag cattgatttt tctgaaaccc 2373
 gctcgaaaat gggactttat ctttgccatg caaaaagggtg attgcgcgac tatttgctcg 2433
 55 catctgaaca gtgactgact gcagactttt cagaaaagtg ttaagggttat tatgtaaact 2493
 aaaaattgag ttactgattc atggtatggc actgtgagcg gtggttcatt tggacttgta 2553
 60 gggggaattg catgtatcaa tcaaaaacac acaatcatcg atttaccggt caccttgcca 2613
 gtgcgaagac acggttgccg ctagtagcat tgatttcaac gatgggtggc ctgctttttg 2673

ES 2 278 737 T3

gctatgacac tggggtgac aatggcgcat tgccttttat ttcttcggaa ctgaaacttg 2733
 cccctggatc acaggggttg gtcaccagta gcttgacgct ggggtgctgct tttggtgcta 2793
 5 tcttagtcgg tcgtttaagt gatcgctatg ggcgcaggcg gctcatcacc atgttagcgg 2853
 gcttattttt tctggcaacg gtagcctcgt cactttcccc gagtgctggc tggctgattg 2913
 10 gcgcacggct gatccttgga ttagccgttg gcggcgtctc tgtgctgggt ccaagctttt 2973
 tagcagagat tgccccaacg agtcatcgtg ggcgggttagt cacacaaaat gagctgatgg 3033
 15 tcgtgactgg ccagttactt gcttttggtc tcaatgcctt tttaggaacc acttttggtg 3093
 acgttcctgg tatctggcgc tggatgattg tattggcagt cattccggca attatcttag 3153
 gtatcgggac ttattttggt ccggaatctc ctcggtgggt aatgatgaaa ggacggccgg 3213
 20 cagcagcacg ttcaagtttg gaagtgttgc gatctgctgc tgaagtgccg gcagagattg 3273
 accatttgaa acagaatctt gccgaagatg ctaaacataa gcaggcgagt gttcgagcat 3333
 25 tgaaaaccaa atggattcgc cgactgggtc tgattggcat cggcctaggc gtcattcagc 3393
 aaattgctgg tatcaatgtc atgatgtatt atggcacctc aattttacaa atgacggggt 3453
 30 ttgggcgaga tagcgcttg atcgccaaca ttgccaatgg ggttactgcc gttgctgcaa 3513
 cgattgtgac gttgcaattg ttgaagcatg ttccgcggcg gccaatgctg attgtgggat 3573
 tgattggctc aaccgtggcg attactggtg tcaccttcgc tagtcgacta ccagcgggtt 3633
 35 cgccattccg ggcatttgcg acaatcggga tgatgatgct gttcttggcg ttctccaag 3693
 gcgctatcag tccaatgact tggctgctga tgtctgaaat ctccctgaa cagggttcggg 3753
 40 gcatagggat gggcgctgca accttctgct tgtggttagc taactttggt gttggcggtc 3813
 tgttcccgat tggctcggcc caaataggca tgttctggac attcgtttgc ttcacggga 3873
 45 caaatttgat ttcattgctt ttcgttctga tttttgtgcc ggaaacggct ggacgctccc 3933
 tcgaaacttt gcaccgagag gagaaagccc gcttaaatca ttaatgacaa gcgatttggt 3993
 50 caagaccaa aagttgcgtt ttacaaaaag ttgatacca taaagggtgta tcaacaattc 4053
 gatgaacctt cacaaagggg agccattggc tgagaacggg gaaaccggga cccttcgaac 4113
 ctgttcgtta atgcgagcgt agggatttgt gaatggt 4150

<210> 2

<211> 88

<212> PRT

<213> *Lactobacillus casei*

ES 2 278 737 T3

<400> 2

```

Met Glu Lys Arg Glu Phe Asn Ile Ile Ala Glu Thr Gly Ile His Ala
 1          5          10          15
Arg Pro Ala Thr Leu Leu Val Gln Ala Ala Ser Lys Phe Asn Ser Asp
          20          25          30
Ile Asn Leu Glu Tyr Lys Gly Lys Ser Val Asn Leu Lys Ser Ile Met
          35          40          45
Gly Val Met Ser Leu Gly Val Gly Gln Gly Ala Asp Val Thr Ile Ser
          50          55          60
Ala Glu Gly Ala Asp Glu Ala Asp Ala Ile Ala Ala Ile Thr Asp Thr
          65          70          75          80
Met Lys Lys Glu Gly Leu Ala Glu
          85

```

<210> 3

<211> 575

<212> PRT

20 <213> *Lactobacillus casei*

<400> 3

```

Met Ala Glu His Leu Lys Gly Ile Ala Ala Ser Asp Gly Ile Ala Thr
 1          5          10          15
Ala Lys Ala Tyr Leu Leu Val Gln Pro Asp Leu Ser Phe Gln Lys Lys
          20          25          30
Thr Val Asp Asp Pro Ser Lys Glu Ile Asp Arg Leu Lys Gln Ser Leu
          35          40          45
Asp Gln Ser Asn Asp Glu Leu Lys Val Ile Arg Ala Lys Ala Ala Glu
          50          55          60
Ser Leu Gly Glu Glu Glu Ala Gln Val Phe Asp Ala His Met Met Ile
          65          70          75          80
Leu Ala Asp Pro Asp Phe Thr Gly Gln Val Glu Thr Lys Ile Lys Asp
          85          90          95
Glu Lys Val Asn Ala Glu Gln Ala Leu Lys Glu Val Ser Glu Phe Phe
          100          105          110
Ile Lys Thr Phe Glu Gly Met Thr Asp Asn Pro Tyr Met Gln Glu Arg
          115          120          125
Ala Ala Asp Val Arg Asp Val Thr Lys Arg Ile Met Ala His Leu Leu
          130          135          140
Gly Arg Asn Leu Pro Asn Pro Ala Leu Ile Asp Glu Glu Val Val Val
          145          150          155          160
Val Ala His Asp Leu Thr Pro Ser Asp Thr Ala Gln Leu Asn Lys Lys
          165          170          175
Tyr Val Lys Ala Phe Val Thr Asp Ile Gly Gly Arg Thr Ala His Ser
          180          185          190
Ala Ile Met Ala Arg Ser Leu Glu Ile Pro Ala Val Val Gly Thr Asp
          195          200          205
Asp Ile Thr Lys Lys Ala Asn Asn Gly Asp Leu Ile Ser Val Asp Gly
          210          215          220
Leu Thr Gly Glu Val Val Val Asp Pro Thr Asp Asp Glu Val Ala Lys
          225          230          235          240
Phe Lys Gln Asp Ala Glu Ala Phe Ala Lys Gln Lys Ala Glu Trp Ala
          245          250          255
Leu Leu Lys Thr Ala Lys Ser Ile Thr Ala Asp Gly Lys His Phe Asp
          260          265          270
Val Ala Ala Asn Ile Gly Thr Pro Lys Asp Leu Asp Gly Val Leu Ala
          275          280          285
Asn Gly Ala Glu Gly Ile Gly Leu Tyr Arg Thr Glu Phe Leu Tyr Met
          290          295          300

```

ES 2 278 737 T3

	Asp	Ser	Ala	Glu	Leu	Pro	Thr	Glu	Asp	Asp	Gln	Phe	Glu	Ala	Tyr	Lys
	305					310					315					320
5	Lys	Val	Val	Glu	Thr	Met	Ser	Pro	Lys	Pro	Val	Val	Val	Arg	Thr	Met
					325					330						335
	Asp	Ile	Gly	Gly	Asp	Lys	His	Leu	Pro	Tyr	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Glu
				340					345					350		
10	Gln	Asn	Pro	Phe	Leu	Gly	Tyr	Arg	Ala	Ile	Arg	Ile	Ser	Leu	Asp	Arg
			355					360					365			
	Gln	Asp	Ile	Phe	Arg	Thr	Gln	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Arg	Ala	Ser	Ala
	370						375					380				
15	Phe	Gly	Asn	Leu	Arg	Ile	Met	Phe	Pro	Met	Ile	Ala	Thr	Ile	Ala	Glu
	385					390					395					400
	Phe	Lys	Gln	Ala	Arg	Gln	Ile	Phe	Thr	Glu	Glu	Lys	Asp	Lys	Leu	Val
				405						410					415	
20	Lys	Asp	Gly	Val	Lys	Val	Ser	Asp	Asp	Ile	Gln	Leu	Gly	Ile	Met	Ile
			420					425					430			
	Glu	Ile	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Asp	Gln	Phe	Ala	Lys	Tyr	Val
		435						440				445				
25	Asp	Phe	Phe	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Asp	Leu	Ile	Gln	Tyr	Ser	Met	Ala
	450					455						460				
	Ala	Asp	Arg	Gly	Asn	Glu	His	Val	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Asn
	465				470					475						480
30	Pro	Ser	Ile	Leu	Arg	Leu	Ile	Lys	His	Val	Ile	Asp	Ser	Ala	His	Lys
				485						490					495	
	Glu	Gly	Lys	Trp	Ala	Gly	Met	Cys	Gly	Glu	Ala	Ala	Gly	Asp	Pro	Ile
			500						505				510			
35	Met	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Met	Gly	Leu	Asp	Glu	Tyr	Ser	Met	Ser
		515					520					525				
	Ala	Thr	Ser	Val	Leu	Lys	Val	Arg	Ser	Leu	Met	Lys	Lys	Leu	Ser	Thr
	530					535					540					
40	Ala	Asp	Met	Ala	Lys	Met	Asp	Glu	Ile	Ala	Leu	Asn	Gln	Asn	Ile	Thr
	545				550					555						560
	Asn	Asp	Glu	Asn	Ala	Asp	Leu	Val	Lys	Lys	Thr	Thr	Gly	Gln	Lys	
				565					570						575	